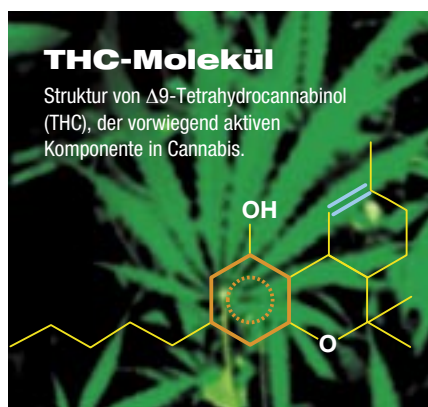


Gängige GC/MS-Methoden sind meist nicht sensitiv genug, den Cannabiswirkstoff THC im Speichel nachzuweisen. Applikateuren der US-amerikanischen GERSTEL Tochter ist es jetzt gelungen, die Lücke zu schließen – dank der Stir Bar Sorptive Extraction



## Drogentest: Cannabiskonsum schnell und sicher ausschließen

**W**er in Deutschland eine mit hohen Sicherheitsauflagen reglementierte Position im öffentlichen Dienst bekleiden will, muss sich gegebenenfalls einem Drogentest unterziehen. In den Vereinigten Staaten von Amerika sind solche Tests gesetzlich festgeschrieben. Sie erfolgen nach den Richtlinien der „Federal Drug Testing Programs“ und dürfen seit 1988 ausschließlich von vom US-Department of Health and Human Services (HHS) zertifizierten Laboratorien durchgeführt werden. Um die Analyse sicherer zu machen, also um Manipulationen während der Probenahme zu verhindern oder Angestellte vor falschen Testergebnissen zu schützen, soll neben Urin nun auch Speichel auf Drogenwirkstoffe un-



tersucht werden. Die für den Nachweis von THC-Metaboliten im Urin eingesetzten GC/MS-Methoden erweisen sich allerdings als nicht sensitiv genug, um die aktive Wirksubstanz des Cannabis, das  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC), im Speichel sicher und empfindlich nachzuweisen. Wie aktuelle Messungen zeigen,

bietet die Stir Bar Sorptive Extraction mit dem GERSTEL-Twister einen Weg aus dem Dilemma.

Sofern der Wirkstoff nicht per Injektion in die Blutbahn oder unter die Haut beziehungsweise als Zäpfchen rektal verabreicht wurde, erweist sich der Speichel allem Anschein nach als besonders geeignet, den Konsum illegaler Drogen festzustellen.

Schließlich fügt sich die Zufuhr von Drogen über den Mund, geschluckt oder geraucht, in den natürlichen Prozess der Atmung und der Nahrungsaufnahme ein und hinterlässt zumindest für bestimmte Zeit Rückstände in Mund- und Rachenraum. Darüber hinaus sprechen ethische und schlicht praktische Gesichtspunkte für die Verwendung von Speichel: Zum einen empfindet der Bewerber die Probenahme weniger als Eingriff in die Intimsphäre, als dies bei der Abgabe von Urin

der Fall sei, die beide unter Aufsicht erfolgten, heißt es in einem Schreiben der HHS. Zum anderen ließen sich Manipulationen bei der Entnahme von Mundflüssigkeit leichter vorbeugen, weshalb die Probe weniger dem Verdacht ausgesetzt sei, sie könne verfälscht oder durch eine unverfängliche Probe ersetzt worden sein. Letztlich erfolge auch die Detektion der Speichelprobe innerhalb von nur einer Stunde: Das Ergebnis läge rasch vor und gäbe obendrein wie kein anderes Auskunft, ob ein Fahrzeuglenker im Moment der Überprüfung durch die Polizei im berauschten Zustand am Straßenverkehr teilgenommen habe, folglich fahruntüchtig war, oder ob der Konsum längere Zeit zurückliege und somit keinen Einfluss auf die Fahrtüchtigkeit gehabt habe.

Über die Pharmakokinetik und Disposition von Drogen in der Mundflüs-

# Experimenteller Teil

## Instrumentierung

Die Analysen erfolgten auf einem GC 6890/MS 5973-System von Agilent Technologies in Verbindung mit dem GERSTEL-KAS 4 sowie einem Thermodesorptionssystem mit Autosampler, wahlweise GERSTEL-TDS 2/TDS A oder MPS 2/TDU.

## Analysebedingungen

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>TDS 2</b>     | splitlos<br>20 °C – 60 °C/min –<br>275 °C (5 min)  |
| <b>KAS 4</b>     | 0,2 min Lösungsmittel-<br>ausblendung (50 mL/min)<br>splitlos<br>40 °C – 12 °C/s – 280 °C<br>(3 min) |
| <b>Säule</b>     | 30 m HP5-MS<br>(Agilent Technologies)<br>di = 0,25 mm, df =<br>0,25 µm                               |
| <b>Pneumatik</b> | He, konstanter Fluss =<br>1,2 mL/min   |
| <b>Ofen</b>      | 60 °C – 30 °C/min –<br>175 °C – 25 °C/min –<br>300 °C (2 min)  |
| <b>MSD</b>       | Scan-Modus,<br>31 – 350 amu  |

## Probenvorbereitung

Eine negative Speichelprobe (1,0 g) wurde in ein 10-mL-Vial eingewogen. Hinzugefügt wurden 9 Milliliter einer 11-%igen Methanol-Wasser-Mischung, die eine bekannte Menge THC enthielt. Als interner Standard wurden (-)- $\Delta$ 9-THC-D3 in einer methanolischen Lösung (5 ng/mL) verwendet. Der Twister wurde in die Lösung gegeben, das Vial verschraubt und die Probe bei Raumtemperatur 90 Minuten lang extrahiert, wobei das THC nahezu quantitativ überführt wurde. Anschließend wurde das Rührstäbchen entnommen, mit Wasser aus einer Flasche gespült, trockengetupft und zur Analyse in ein konditioniertes Thermodesorptionsröhrchen gegeben. Die Desorption erfolgte verschleppungsfrei bei 275 °C.

## Kühlfalle

Während der Thermodesorption wird das THC im Glasverdampferrohr des kalten KAS 4 refokussiert, bevor die Aufgabe auf die GC-Säule erfolgt. Bei 40 °C wurde THC gut angereichert, ein flüssiges Kühlmittel war nicht erforderlich, weshalb sich die Methode auch auf dem vollständig Peltier-gekühlten GERSTEL-TDU/KAS 4-System ausführen lässt.

## GC-Methode

Unter Verwendung einer Standard-GC-Säule (HP5-MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) und dem Full-Scan-Modus am MS 5973 wurden gute Retentionszeiten und Peakformen erzielt (siehe Abb. A, S. 13). Die entsprechende extrahierte Ionenspur 299 zeigte keine Störung (siehe Abb. B, S. 13), was eine schnellere Aufheizung am GC 6890 erlaubte, um die Elution des THC in weniger als 10 Minuten zu erreichen. Kam der GERSTEL-Modular-AcceleratedColumnHeater (MACH) zum Einsatz, ließ sich die GC-Laufzeit weiter verkürzen. Um möglichst niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen, wurde die Methode auf den SIM-Modus (Masse 299) umgestellt mit (-)- $\Delta$ 9-THC-D3 als internem Standard.

## Validierung und Quantifizierung

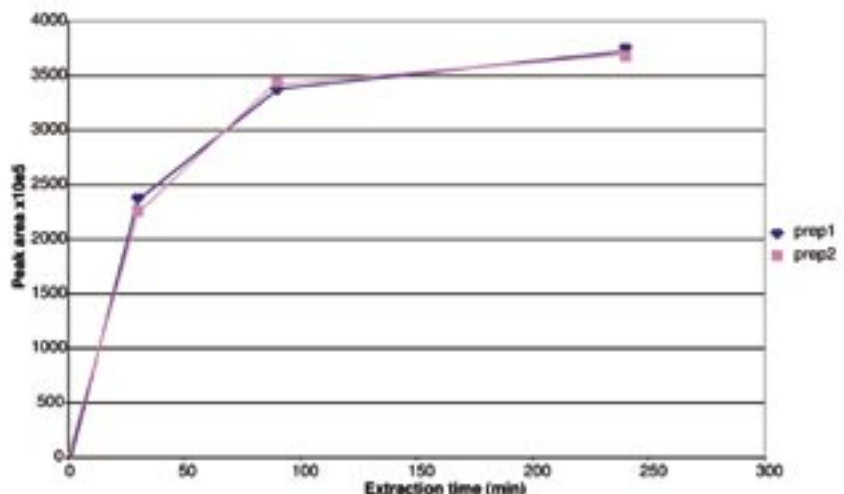
Die Methode wurde auf ein zweites GC 6890/MS 5975-System mit GERSTEL-MPS 2 und GERSTEL-TDU übertragen, das die automatisierte Analyse von bis zu 196 Proben erlaubt. Die Anforderungen an die Methodvalidierung entsprechend NLCP Guidance Document for Laboratories and Inspectors wurden eingehalten.

sigkeit ist bislang noch wenig bekannt. Man weiß aber, dass Opiate, Amphetamine, Kokain und die meisten anderen Drogen, einschließlich zentral wirkender Medikamente, durch Diffusion aus dem Blutstrom in die Mundflüssigkeit gelangen. Anders verhält es sich mit der aktiven Komponente von Cannabis:

THC gelangt nicht über den Blutkreislauf in die Mundflüssigkeit; wird es dort nachgewiesen, dann nur nach unmittelbar vorausgegangenem Drogenkonsum.

Die Richtlinien der HHS (Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs) sehen einen Wert von 2,0 Nanogramm THC je Milliliter Mundflüssigkeit vor. Der relativ niedrige Grenzwert und das im Vergleich zu den entsprechenden Parametern bei der Drogenkontrolle in Urin kleine Probenvolumen erweist sich als Herausforderung: „Die GC/MS-Verfahren, die zertifizierte Laboratorien anwenden, um THC-Meta-

Bei der Extraktion von THC lieferte der Twister im Schnitt bei 90 Minuten Extraktionsdauer die besten Ergebnisse.





## Drogentest: Cannabiskonsum schnell und sicher ausschließen

boliten im Urin nachzuweisen, sind nicht sensitiv genug, um damit den THC-Gehalt von Speichelproben untersuchen zu können“, sagt Ed Pfannkoch, Applikationschemiker der GERSTEL, Inc. in Baltimore, USA.

Aufgrund bisheriger positiver Erfahrungen beim Nachweis von Drogen, pharmazeutischen Wirkstoffen, Metaboliten, Pheromonen oder PCB aus biologischen Matrices setzten die GERSTEL-Applikateure zur Extraktion des THC aus Speichel auf die Stir Bar Sorptive Extraction mit dem GERSTEL-Twister.

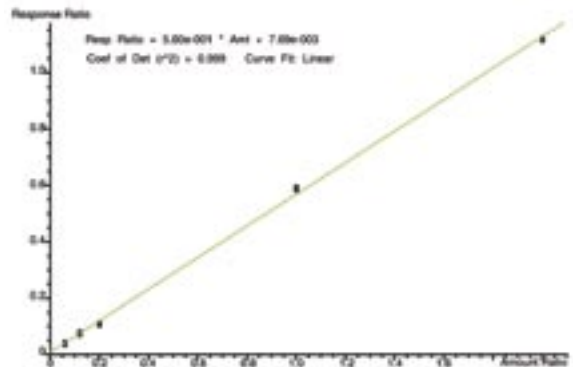
Die Speichelprobe wurde mit einem Gemisch aus Wasser und Methanol verdünnt und mit dem Twister durchmischt. Wie sich zeigte, wurde das THC dabei mit hohem Wirkungsgrad und minimaler Matrixstörung extrahiert, ohne dass eine zusätzliche Probenreinigung erforderlich gewesen wäre: „Nach Thermodesorption des Twisters konnten wir THC sicher und empfindlich mittels GC/MS nachweisen. Die Nachweisgrenze lag unter einem Nanogramm THC je Milliliter Speichel und damit deutlich unter den Forderungen der HHS“, erklärt Ed Pfannkoch und ergänzt: „Mit unserer Vorgehensweise können wir die bestätigenden Untersuchungsparameter, also Chromatographie, Auflösung, drei ausgewählte Ionen

mit akzeptablen Ionen-Abundanz-Verhältnissen, Erfordernisse der Qualitätskontrolle, LOD/LOQ etc., die mehr als 20 Jahre lang durch das National Laboratory Certification Program für bestätigende Untersuchungen von Drogen in Urin angewendet wurden, auf die anspruchsvollere Analyse von THC in Mundflüssigkeit ausweiten.“

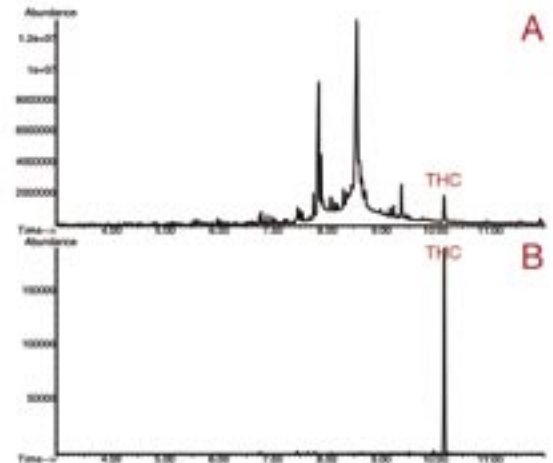
### Weitere Informationen

- „Feasibility of Extraction and Quantitation of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol in Body Fluids by Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and GC/MS“, AppNote 6/2005 (<http://www.gerstel.com/p-gc-an-2005-06.pdf>)
- Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs (Download: <http://workplace.samhsa.gov/drugtesting/SpecimenCollection/guidelinesdraft2.pdf>)
- Proposed Revisions to Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs (<http://store.health.org/catalog/productsDetails.aspx?ProductID=16832>)

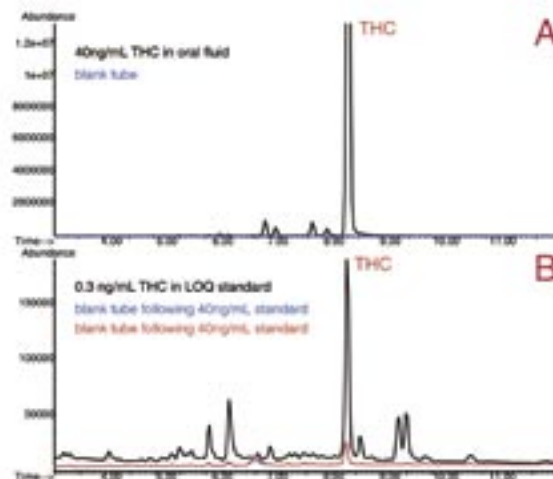
Fünf-Punkt-SIM-Kalibrierung des internen Standards (0,3 – 10,0 ng/mL THC) in Mundflüssigkeit. Wenn ein auf 5 ng/mL konzentrierter interner Standard verwendet wurde, ergab der niedrigste Kalibrationspunkt (0,3 ng/mL in Mundflüssigkeit) ein Signal, das etwa 5-mal größer war als das Rauschen in einem negativen Speichel auf Grund ungekennzeichneter THC im IS. Zur Methodenvalidierung wurde die Konzentration auf 1 ng/mL reduziert.



(A) Full-Scan (31 – 350 amu) GC/MS-Spur für Mundflüssigkeit, die mit 20 ng/mL THC versetzt wurde; (B) Extrahierte Ionenspur (299) für Mundflüssigkeit, die mit 20 ng/mL THC versetzt wurde.



(A) Vergleich der 40 ng/mL-Twister-Extraktion mit anschließendem Leerröhrchen; (B) Die Überlagerung des LOQ-Standards und des Leerröhrchens, das einem 40 ng/mL hohem Standard folgte, zeigt, dass die Verschleppung vernachlässigbar ist.



| Probe Nr.    | Versetzt mit ng/mL | Ergebnis ng/mL | % RSD |
|--------------|--------------------|----------------|-------|
| 1            | 0,5                | 0,51           |       |
| 2            | 0,5                | 0,51           |       |
| 3            | 0,5                | 0,49           |       |
| 4            | 0,5                | 0,50           |       |
| 5            | 0,5                | 0,49           |       |
| Durchschnitt |                    | 0,50           | 2,00  |
| 6            | 2,0                | 1,99           |       |
| 7            | 2,0                | 2,13           |       |
| 8            | 2,0                | 1,97           |       |
| 9            | 2,0                | 2,00           |       |
| 10           | 2,0                | 2,02           |       |
| Durchschnitt |                    | 2,02           | 3,12  |
| 11           | negativ            | n.d.           | n.a.  |
| 12           | negativ            | n.d.           | n.a.  |

(n.d. = nicht detektiert; n.a. = nicht anwendbar)

Quantifizierung von THC in Mundflüssigkeit. Zwölf negative Mundflüssigkeitsproben eines gesunden Freiwilligen wurden mit THC versetzt: fünf davon mit 0,5 ng/mL, weitere fünf mit 2,0 mg/mL; zwei wurden als negative Kontrollproben verwendet.